

## Fixation non symbiotique de l'azote dans la rhizosphère de quelques non-légumineuses tropicales

PAR

WEINHARD (Pierrette), BALANDREAU (J.), RINAUDO (G.),  
DOMMERGUES (Y.) (1)

Centre de Pédologie du C.N.R.S., Vandœuvre-lès-Nancy, France  
et Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer, Dakar, Sénégal

### I. — INTRODUCTION

Se fondant d'une part sur des observations de nature agronomique (notamment absence de réponse de certaines graminées à la fertilisation azotée), d'autre part sur l'existence d'associations relativement étroites entre les racines de certaines plantes (cane à sucre, *Paspalum* sp.) et des micro-organismes fixateurs d'azote non symbiotiques (*Beijerinckia* sp., *Azotobacter paspali*), DÖBEREINER (1968) a émis l'hypothèse que la fixation d'azote pouvait être relativement élevée dans la rhizosphère d'espèces tropicales. Par contre, d'autres auteurs, dont MISHUSTIN et SHILNIKOVA (1969), considèrent que cette fixation est *a priori* négligeable, tout au moins en ce qui concerne *Azotobacter*; en effet, si l'on admet (1) que l'exsudation racinaire est de l'ordre de 250 kg de matière sèche/ha/an et que les *Azotobacter* en utilisent le dixième, soit 25 kg, (2) que le rendement de fixation est de l'ordre de 1,0-1,5 %, la fixation d'azote serait seulement de 0,25-0,37 kg/ha/an, ce qui est insignifiant. Mais les données — d'ailleurs incertaines — servant de base au calcul de MISHUSTIN concernent des systèmes tempérés; elles ne sont pas obligatoirement applicables à des systèmes tropicaux, de sorte qu'elles n'infirmement l'hypothèse de DÖBEREINER.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons cherché à déterminer au laboratoire l'activité fixatrice d'azote dans la rhizosphère de quelques plantes tropicales, en utilisant la méthode de réduction de l'acétylène en éthylène. Cette

O. R. S. T. O. M.

\* Reçu le 11-V-71.

(1) Avec la collaboration technique de M. BOUREAU, O.R.S.T.O.M., Dakar.

Collection de Référence

n° 5034

22 OCT. 1971

méthode, qui est de plus en plus utilisée pour estimer la fixation de l'azote dans différents types de systèmes biologiques, est parfaitement adaptée à l'étude de la rhizosphère tout au moins celle du riz, ainsi que nous l'avons vérifié récemment (RINAUDO et DOMMERGUES, 1971).

## II. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les plantes testées ont été le riz (variété IR 8), deux graminées fréquemment utilisées en milieu tropical (*Eleusine coracana* et *Paspalum virgatum*) et une cypéracée (*Cyperus zollingeri*) provenant d'une savane ouest-africaine (Lamto), choisie en raison de la facilité avec laquelle elle se développe au laboratoire.

Ces plantes ont été cultivées, soit à partir de graines (riz, *E. coracana*), soit à partir d'éclats de souche (*P. virgatum*, *C. zollingeri*), dans des tubes à essai en verre de 12 × 120 mm (riz) (RINAUDO, 1970) ou des boîtes parallépipédiques en chlorure de polyvinyle transparent de 50 × 15 × 100 mm (autres plantes) (DOMMERGUES *et al.*, 1969), les racines étant protégées de la lumière par un écran opaque. Pendant toute la durée des expériences, on a maintenu les conditions suivantes :

- intensité lumineuse : 30 000 Lux ; photopériode 16 h. d'illumination ;
- température :  $28 \pm 2^\circ \text{C}$  ;
- humidité atmosphérique 70 à 90 % ;
- sol engorgé pour toutes les plantes sauf *Eleusine coracana* pour laquelle l'humidité a été voisine de la capacité au champ.

Ces conditions correspondent sensiblement à celles qui règnent *in situ*, à l'exception de la photopériode qui y est plus courte et de l'humidité du sol qui n'y atteint pratiquement jamais l'engorgement pour *P. virgatum*.

La première expérience a porté sur le riz cultivé sur trois sols ferrallitiques alluviaux de Côte d'Ivoire (RINAUDO, 1970). La deuxième expérience a porté sur *E. coracana* cultivé d'une part sur le sol ferrugineux tropical de Lamto, Côte d'Ivoire (DELMAS, 1967), d'autre part sur le sol tropical non lessivé de Bambey, Sénégal (BONFILS et FAURE, 1956). La troisième expérience a porté sur *P. virgatum* cultivé sur sol ferrallitique de Nanisana, hauts plateaux de Madagascar (CELTON *et al.* 1966). La quatrième expérience a porté sur *C. zollingeri* cultivé sur le sol ferrugineux tropical de Lamto.

On a déterminé l'activité nitrogénasique des deux systèmes suivants (1) *sols rhizosphériques*, c'est-à-dire sols avec plantes (système sol + plante entière), (2) *sols non rhizosphériques*, c'est-à-dire sols sans plante placés dans la chambre climatique dans les mêmes conditions que les sols avec plante (système sol sans plante). Le test de réduction de l'acétylène en éthylène a consisté à placer l'un ou l'autre système dans un flacon, maintenu à l'obscurité, rempli d'un mélange gazeux (Ar : 90 ; C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> : 10) et à doser, au bout de 7 h., 24 h., 30 h. environ, la quantité d'éthylène provenant de la réduction de l'acétylène par la nitrogénase présente. Soit R la quantité d'éthylène trouvée à la nième heure dans le sol rhizosphérique et S la quantité d'éthylène

trouvée à la nième heure dans le sol non rhizosphérique, l'effet rhizosphère est représenté par la différence  $\Delta = R - S$ . A partir des valeurs de  $\Delta$  obtenues après 7, 24 et 30 h., on a tracé, pour chaque échantillon, la courbe de production de l'éthylène en fonction du temps, ce qui a permis de calculer la vitesse maximale de production d'éthylène. On a admis que cette vitesse maximale mesurait l'activité nitrogénasique due à l'effet rhizosphère. Il est à noter que dans tous les cas, l'activité nitrogénasique dans le sol non rhizosphérique a toujours été très faible par rapport à l'activité dans le sol rhizosphérique. L'activité nitrogénasique due à l'effet rhizosphère a été exprimée en fonction du poids sec de racines et non en fonction du poids de sol.

### III. — RÉSULTATS

Dans certaines expériences, l'activité nitrogénasique peut présenter une variabilité considérable ; c'est ainsi que, dans le cas de l'expérience 3, l'activité varie de 4 à 4 030 nmoles/h/g de racines sèches. Cette variabilité semble

TABLEAU I

Activité nitrogénasique de rhizosphères de graminées et d'une cypéracée tropicales

Expérience n°	Plante		Sol	Activité nitrogénasique exprimée en nmoles C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /h/g racine (poids sec)
	Espèce	Age (jours) ou stade végétatif		
1	Riz	14	alluvial ferrallitique, Dabou	2 360 ± 113
		35	<i>id.</i>	1 800 ± 274
		14	alluvial ferrallitique, Abengourou	1 040 ± 162
		35	<i>id.</i>	1 190 ± 140
		14	alluvial ferrallitique, Yamoussokro	2 290 ± 326
		35	<i>id.</i>	1 430 ± 205
2	<i>Eleusine coracana</i>	24	ferrugineux tropical, Lamto	374 ± 165
			ferrugineux tropical, Bambey	1,3 ± 0,5
3	<i>Paspalum virgatum</i>	phase de croissance floraison	ferrallitique, Nanisana <i>id.</i>	528 ± 48 1 032 ± 1 018
4	<i>Cyperus zollingeri</i>	floraison	ferrugineux tropical, Lamto	162 ± 47

en général être d'autant plus importante que les plantes sont plus âgées ; des expériences effectuées par ailleurs montrent en outre que l'activité nitrogénasique semble varier davantage chez certaines espèces (maïs) que chez d'autres (riz) (BALANDREAU *et al.*, 1971). Malgré cette variabilité, il est possible dès maintenant, de tirer du tableau I les conclusions suivantes :

1) l'activité nitrogénasique dépend de l'espèce végétale considérée, donc de son aptitude à libérer des quantités plus ou moins importantes d'exsudats favorisant la microflore fixatrice d'azote. Le riz apparaît comme une espèce particulièrement favorable à ce point de vue ;

2) l'activité nitrogénasique dépend étroitement du type de sol considéré. C'est ainsi que, dans le cas du riz, des différences significatives entre les 3 sols ont pu être mises en évidence. Le cas d'*Eleusine coracana* est encore plus frappant : l'activité nitrogénasique est environ 300 fois plus élevée dans le sol de Lamto que dans celui de Bambey, la seule différence importante entre les deux sols résidant dans une teneur en matière organique plus élevée dans le premier (C = 0,8 %) que dans le deuxième (C = 0,2 %).

Comparativement aux résultats obtenus antérieurement dans notre laboratoire (HAUCKE-PACEWICZOWA *et al.*, 1970) et aux résultats obtenus par DÖBEREINER *et al.* (1971), les activités nitrogénasiques mesurées ici apparaissent considérables non seulement dans le cas du riz, qui constitue un cas exceptionnel, mais aussi dans celui de graminées telles que *Paspalum virgatum*. Ainsi, dans le cas d'un *Paspalum* (*P. notatum* var. *batatais*) cultivé au champ, DÖBEREINER *et al.* n'ont pas trouvé une activité nitrogénasique supérieure à 128 nmoles C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/g de racines sèches, alors que nous atteignons des valeurs de l'ordre de 500 à 1 000. Les fortes activités nitrogénasiques figurant au tableau I peuvent s'expliquer par l'intervention (1) de facteurs stimulant l'exsudation racinaire (intensité lumineuse élevée ; humidité de l'air élevée ; jeunesse des plantes) (2) de facteurs édaphiques particulièrement favorables à l'activité fixatrice : engorgement, certaines propriétés physiques et chimiques encore mal définies, telles que la présence dans le sol de certains composés organiques.

On pourrait penser que ces chiffres d'activité élevés sont dus à la pollution des sols par des algues ; il semble que cette hypothèse doive être écartée, car les échantillons de sol seul (sol non rhizosphérique), qui ont été exposés à la lumière comme les échantillons comportant les plantes, ne présenteraient aucune activité nitrogénasique ; il est peu probable que les algues aient pu être stimulées par les plantes dans le cas du sol rhizosphérique.

Il est impossible d'extrapoler au champ les résultats obtenus au laboratoire pour deux raisons majeures : 1) les conditions de culture adoptées au laboratoire simulent très imparfaitement les conditions régnant effectivement *in situ* ; 2) on ne connaît pas le poids à l'hectare de racines actives sur le plan de l'exsudation, ce poids ne représentant, semble-t-il, qu'une faible fraction du poids total de racines. Seules des mesures *in situ* pourront apporter des éclaircissements dans ce domaine.

Quoi qu'il en soit, il nous a semblé intéressant de comparer l'activité nitrogénasique des « systèmes fixateurs non symbiotiques que constituent les rhizosphères de graminées » avec l'activité correspondante de systèmes fixa-

teurs mieux connus que sont les « systèmes fixateurs symbiotiques des légumineuses et des non-légumineuses ». Pour faciliter cette comparaison, nous avons regroupé sur le tableau II les données concernant les activités nitrogénasiques des deux types de systèmes, les chiffres étant exprimés en fonction des *poids secs de racines ou de nodules*. Ce tableau montre clairement que le système fixateur non symbiotique de la rhizosphère se classe nettement en dessous des systèmes fixateurs symbiotiques. Mais étant donné que, pour une même surface de sol, le poids de racines graminéennes capables d'héberger une activité nitrogénasique notable serait, dans certaines conditions tout au moins (engorgement, forte luminosité notamment), beaucoup plus élevée que le poids de nodules de légumineuses, on peut penser que la fixation non symbiotique pourrait alors être du même ordre de grandeur que la fixation symbiotique.

TABLEAU II

Activité nitrogénasique dans des systèmes non symbiotiques (rhizosphères de graminées) et dans des systèmes symbiotiques (nodules de légumineuses et de non-légumineuses)

	Espèce	Activité nitrogénasique exprimée en nmoles C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /h/g racines sèches ou nodules secs	Références
Systèmes non-symbiotiques fixateurs d'azote	Riz	1 040 — 2 360	} Présente note DÖBEREINER et al., 1971
	<i>Eleusine coracana</i>	1 — 374	
	<i>Paspalum virgatum</i>	528 — 1 032	
	<i>Paspalum notatum</i>	1 — 128	
Systèmes* symbiotiques fixateurs d'azote (souches effectives)	<i>Soja hispida</i>	20 000 — 80 000 60 000 — 80 000	} HARDY et al., 1968 DÖBEREINER et al., 1971
	<i>Pisum sativum</i>	26 880 — 32 880	
	<i>Trifolium pratense</i>	55 680 — 65 760	} SCHWINGHAMER et al., 1970
	<i>Medicago sativa</i>	84 800	
	<i>Myrica gale</i>	24 000 — 56 000	} WHEELER, 1969
	<i>Alnus glutinosa</i>	8 000 — 24 000	

\* Pour transformer les données de la littérature exprimées en fonction des poids frais de nodules en données exprimées en fonction des poids secs ; on a admis que le rapport « matière sèche : matière fraîche » est en moyenne de 0,25.

## RÉSUMÉ

L'activité nitrogénasique dans la rhizosphère de quelques non-légumineuses tropicales cultivées au laboratoire dans des conditions simulant l'environnement tropical, a été déterminée par la méthode de réduction de l'acétylène en éthylène. L'activité nitrogénasique dépend de l'espèce végétale considérée : elle est

très élevée dans le cas du riz cultivé sur des sols alluviaux ferrallitiques (1 040-2 360 nmoles  $C_2H_4$ /h/g racines sèches); elle est, par contre, faible dans le cas d'*Eleusine coracana* cultivé sur sol ferrugineux tropical (1,3 nmole  $C_2H_4$ /h/g racines sèches). L'activité nitrogénasique dépend aussi étroitement du type de sol : ainsi, pour une même espèce (*E. coracana*), elle est 300 fois plus élevée dans un sol que dans l'autre.

L'activité nitrogénasique des systèmes fixateurs d'azote symbiotiques (nodules de légumineuses et de non-légumineuses) est *grosso modo* 100 fois plus élevée que l'activité nitrogénasique des systèmes fixateurs non symbiotiques (micro-organismes fixateurs libres des rhizosphères). Mais étant donné que la biomasse des premiers systèmes par unité de surface de sol est beaucoup plus faible que la biomasse des derniers systèmes, on peut admettre que la fixation non symbiotique d'azote dans les rhizosphères joue un rôle significatif, notamment dans les environnements tropicaux.

#### SUMMARY

Nitrogenase activity in the rhizosphere of some tropical non-legumes grown in laboratory under conditions simulating the tropical environment, has been measured by the acetylene reduction method. Nitrogenase activity depended on the plant species: it was high in the case of rice growing on ferrallitic alluvial soils (1,040-2,360 nmole  $C_2H_4$ /h/g dry root); it was low in the case of *Eleusine coracana* growing in a ferruginous tropical soil (1.3 nmole  $C_2H_4$ /h/g dry root). Nitrogenase activity was also shown to be strictly dependent on the soil type: thus for the same species (*E. coracana*), it was 300-fold higher in one soil than in the other.

Nitrogenase activity of symbiotic nitrogen fixing systems (namely nodules of legumes and non-legumes) was roughly 100 times as great as nitrogenase activity of non symbiotic fixing systems (namely free nitrogen fixing microorganisms in the rhizospheres). But being given that the biomass of the former systems per surface unit of soil is much lower than the biomass of the later, one may assume the significance of non symbiotic nitrogen fixation in the rhizospheres, specially in tropical environments.

#### REFERENCES

- BALANDREAU (J.) WEINHARD (P.), RINAUDO (G.), DOMMERGUES (Y.), 1971. — Influence de l'éclaircissement de la plante sur la fixation non symbiotique d'azote dans la rhizosphère. *Cécol. Pl.* (sous presse).
- BONFILS (P.), FAURE (J.), 1956. — Les sols de la région de Thiès. *Annls Cent. Rech. agron. Bambey*, 16: 5-92.
- CELTON (J.), VELLY (J.), ROCHE (P.), 1966. — Fertilisation et redressement. Diagnostic foliaire des carences minérales sur les sols de cultures sèches à Madagascar. *Doc. I.R.A.M.* n° 79, 37 p.
- DELMAS (J.), 1967. — Recherches écologiques dans la savane de Lamto (Côte-d'Ivoire) : premier aperçu sur les sols et leur valeur agronomique. *La Terre et la vie*, 21: 216-248.
- DÖBEREINER (J.), 1968. — Non-symbiotic nitrogen fixation in tropical soils. *Pesq. agropec. bras.*, 3: 1-6.

- DÖBEREINER (J.), DAY (J.), DART (P. J.), 1971. — (Communication personnelle).
- DOMMERMUES (Y.), COMBREMONT (R.), BECK (G.), OLLAT (C.), 1969. — Note préliminaire concernant la sulfato-réduction rhizosphérique dans un sol salin tunisien. *Rev. Écol. Biol. Sol*, **6**: 115-129.
- HARDY (R. W. F.), HOLSTEN (R. D.), JACKSON (E. K.), BURNS (R. C.), 1968. — The acetylene-ethylene assay for  $N_2$  fixation : laboratory and field evaluation. *Pl. Physiol.*, **43**: 1185-1207.
- HAUCKE-PACEWICZOWA (T.), BALANDREAU (J.), DOMMERMUES (Y.), 1970. — Fixation microbienne de l'azote dans un sol salin tunisien. *Soil. Biol. Biochem.*, **2**: 47-53.
- MISHUSTIN (E. N.), SHILNIKOVA (V. K.), 1969. — L'assimilation biologique de l'azote atmosphérique. In *Soil biology*, UNESCO, Paris, **9**: 65-124.
- RINAUDO (G.), 1970. — Fixation biologique de l'azote dans trois types de sols rizières de Côte-d'Ivoire. *Thèse Doct. Ing.*, Fac. Sci. Montpellier.
- RINAUDO (G.), DOMMERMUES (Y.), 1971. — Validité de l'estimation de la fixation biologique de l'azote dans la rhizosphère par la méthode de réduction de l'acétylène. *Annls Inst. Pasteur*, Paris, **121**, 93-99.
- RINAUDO (G.), BALANDREAU (J.), DOMMERMUES (Y.), 1971 — Algal and bacterial non-symbiotic nitrogen fixation in paddy soils. *Pl. Soil* (sous presse).
- SCHWINGHAMER (E. A.), EVANS (H. J.), DAWSON (M. D.), 1970. — Evaluation of effectiveness in mutant strains of rhizobium by acetylene reduction relative to other criteria of  $N_2$  fixation. *Pl. Soil*, **33**: 192-212.
- WHEELER (C. T.), 1969. — The diurnal fluctuations in nitrogen fixation in the nodules of *Alnus glutinosa* and *Myrica gale*. *New Phytol.*, **68**: 675-682.